

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR04/003364

International filing date: 23 December 2004 (23.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR  
Number: 0408600  
Filing date: 03 August 2004 (03.08.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 18 March 2005 (18.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

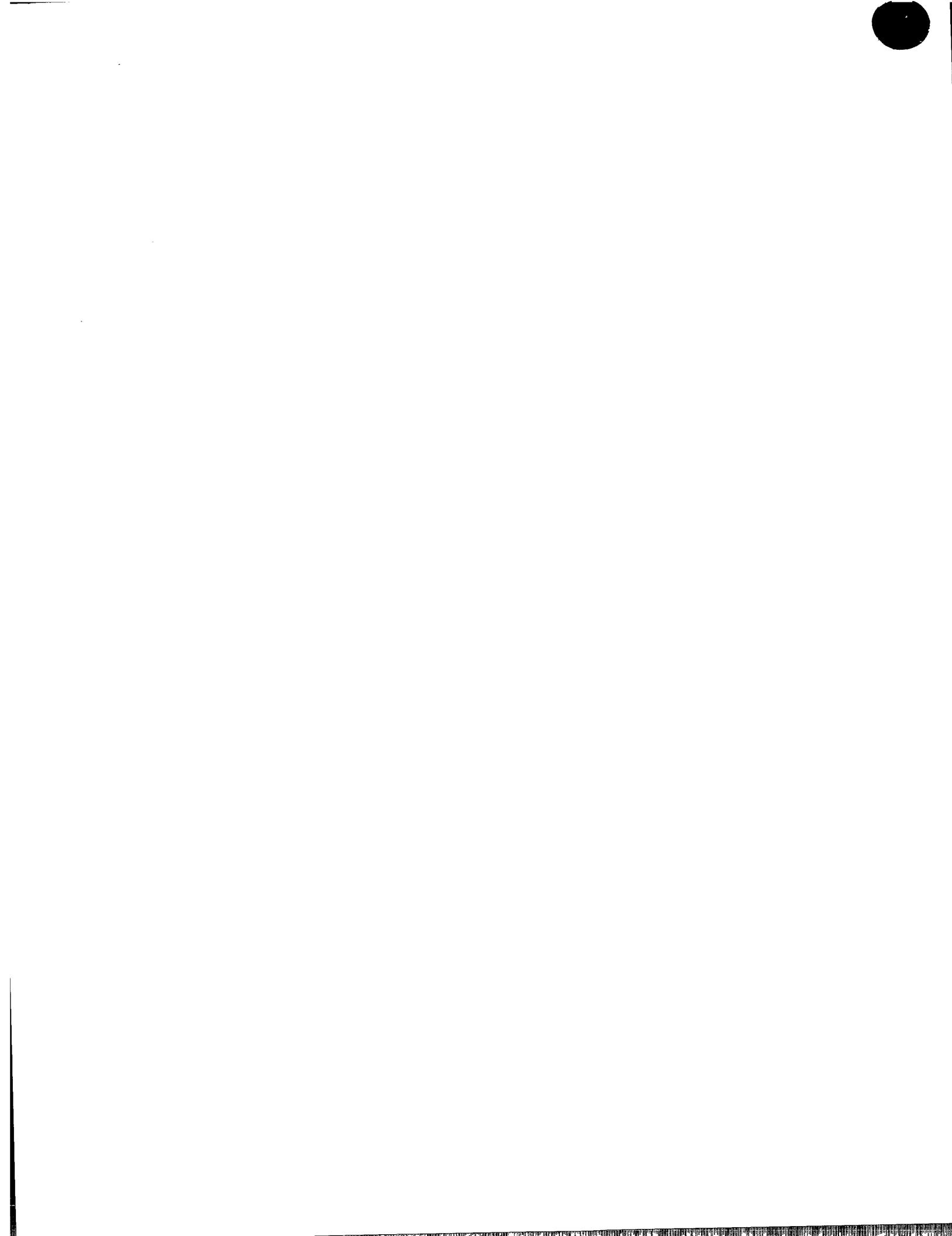
Fait à Paris, le 14 JAN 2005

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIETE  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr





INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

1er dépôt

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa

N° 11354\*03

### REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 © W / 210502

REMISE DES PIÈCES	Réserve à l'INPI
DATE	3 AOUT 2004
LIEU	13 INPI MARSEILLE
N° D'ENREGISTREMENT	0408600
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI	- 3 AOUT 2004
Vos références pour ce dossier ( facultatif ) H52 781 C2/MD	

#### 1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET BEAU DE LOMENIE  
232, Avenue du Prado  
13295 MARSEILLE CEDEX 08

Confirmation d'un dépôt par télécopie	<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>	
Demande de brevet	<input checked="" type="checkbox"/>
Demande de certificat d'utilité	<input type="checkbox"/>
Demande divisionnaire	<input type="checkbox"/>
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale	<input type="checkbox"/> N° N°
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale	<input type="checkbox"/> N° N°
	Date Date

<b>3 TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)	
"Méthode et trousse de détermination du statut vaccinal de personnes"	

<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANÇAISE</b>	
<input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »	

<b>5 DEMANDEUR</b> (Cochez l'une des 2 cases)	
<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale	
INODIAG	
Prénoms	
ano S.A. à conseil d'administration	
N° SIREN	
14 484 444 430	
Code APE-NAF	
Domicile ou siège	Rue
	27 boulevard Jean Moulin
	Faculté de Médecine de la Timone
Code postal et ville	
13005 MARSEILLE	
Pays	
française	
Nationalité	
N° de téléphone ( facultatif )	
N° de télécopie ( facultatif )	
Adresse électronique ( facultatif )	
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »	

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

Réserve à l'INPI

REMISE DES PIÈCES  
DATE 3 AOUT 2004  
LIEU 13 INPI MARSEILLE  
N° D'ENREGISTREMENT 0408600  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W /190600

<b>6 MANDATAIRE</b> Nom PORTAL Prénom Gérard Cabinet ou Société Cabinet BEAU DE LOMENIE  N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel CPI n° 92-1203  Adresse Rue 232 avenue du prado Code postal et ville 13295 MARSEILLE CEDEX 08 / FRANCE  N° de téléphone (facultatif) 04 91 76 55 30 N° de télécopie (facultatif) 04 91 77 97 09 Adresse électronique (facultatif)	
<b>7 INVENTEUR (S)</b> Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <b>Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée</b>	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b> Établissement immédiat ou établissement différé <input checked="" type="checkbox"/>  Paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>  <b>Uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention ( <i>joindre un avis de non-imposition</i> ) <input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt ( <i>joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence</i> ):	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes	
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>  PORTAL Gérard CPI n° 92-1203	
<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
 Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

## METHODE ET TROUSSE DE DETERMINATION DU STATUT VACCINAL DE PERSONNES

La présente invention concerne une méthode et une trousse de diagnostic pour la détermination sérologique du statut vaccinal de personnes. La vaccination consiste à introduire par une voie d'administration appropriée un ou plusieurs antigènes d'un agent pathogène bactérien, viral ou parasitaire, éventuellement associé à une ou plusieurs substances stimulant la réponse immunitaire contre ce (ces) antigènes (adjuvants vaccinaux).

Quelque soit le mode de vaccination, l'objectif est la mise en place chez la personne vaccinée d'une réponse immunitaire spécifique du pathogène comportant une immunité mémoire, c'est à dire susceptible de répondre en quelques heures à une nouvelle introduction du pathogène protégeant ainsi efficacement la personne contre le pathogène. Une modalité particulière et essentielle de l'immunité conférée par la vaccination est la production d'anticorps spécifiques de l'antigène vaccinal.

La protection conférée par la vaccination n'est pas permanente, et ne reste acquise que pour un laps de temps variant de quelques mois à quelques décades. En effet, le pathogène contre lequel est réalisée la vaccination, peut présenter des modifications périodiques de sa composition antigénique rendant partiellement ou complètement caduque la protection conférée par la vaccination avec la composition antigénique précédente. Egalement, la prévalence relative de différents variants antigéniques (sérotypes) du pathogène en fonction du temps et du pays considéré, oblige à modifier la composition du vaccin pour y incorporer les antigènes des sérotypes nouvellement prévalents. Ceci est illustré par les recommandations vaccinales spécifiquement élaborées pour les voyageurs qui se rendent dans

les pays de forte endémie de ces pathogènes [Mackell SM. Vaccinations for the pediatric traveler. Clin. Infect. Dis. 2003,37 :1508-1515 ; Kirkpatrick B.D & Kemper Alston W. Current immunization for travel. Current Opinion in Infections Diseases 5 2003,16 :369-374]. Par ailleurs, la durée de vie des anticorps protecteurs induits par le vaccin est limitée à quelques années en l'absence de nouvelle stimulation antigénique par contact avec le pathogène, ou par une nouvelle vaccination. De même, la réponse individuelle peut varier selon l'état immunitaire au moment de la 10 vaccination et selon la voie d'administration. Ces trois raisons, modifications antigéniques du pathogène, disparition progressive des anticorps protecteurs spécifiques et hétérogénéité de réponse imposent une re-vaccination des personnes sous forme de rappels vaccinaux.

15 La vaccination et l'administration d'un rappel vaccinal peuvent être analysées en tenant compte des effets secondaires connus de certains vaccins, d'une analyse coût/bénéfice, et du libre choix de la personne pour les vaccins qui ne sont pas obligatoires dans le cadre des recommandations publiées sous 20 forme d'un calendrier vaccinal qui précise les modalités d'administration du vaccin et des éventuels rappels de celui-ci [anonyme – Calendrier vaccinal 2003, Avis du Conseil Supérieur d'hygiène publique de France. Bulletin Epidémiologique hebdomadaire 2003, 6 :33-36]. En effet, l'attitude de rappel 25 vaccinal systématique de la population est de plus en plus mise en cause du fait des analyses coût-bénéfice et de la pression de l'opinion publique. Une décision de rappel vaccinal adapté individuellement au statut immunitaire de la personne est donc souhaitable. En effet, le coût de la vaccination est un enjeu 30 considérable non seulement pour les pays industrialisés mais surtout pour les pays en développement (PED) [Carabin H & Edmunds WJ. Future savings from measles eradication in

industrialized countries. J. Infect. Dis. 2003, 187 (suppl 1) :529-535].

La détermination dans le sérum de la personne à vacciner de la présence voire du taux d'anticorps protecteurs spécifiques 5 devrait être un élément clé pour décider l'administration du vaccin ou du rappel vaccinal. En effet, si le sérum de la personne contient des anticorps spécifiques du pathogène à une concentration protectrice, il n'y a aucun bénéfice mais au contraire une prise de risque à administrer un rappel vaccinal à cette personne.

10 La recherche de la présence d'anticorps de classe IgG spécifiques est actuellement réalisée dans les laboratoires pour les virus de la rougeole, des oreillons et de la rubéole. La détermination au laboratoire de la concentration d'anticorps spécifiques n'est réalisée que pour le virus B de l'hépatite : un taux 15 d'anticorps anti HBs > 10 mUI/ml est considéré comme protecteur contre l'infection par le virus B de l'hépatite et ne justifie pas de rappel vaccinal. Pour la détection des anticorps antitétaniques (dirigé contre la toxine tétanique), quelques tests rapides basés sur une technique d'hémagglutination passive (Vacci-test® 20 Pasteur®) ou sur l'immunochromatographie ont été développés pour améliorer la prise en charge des blessés.

Dans les méthodes proposées actuellement, la détection de la présence ou la mesure de la concentration des anticorps spécifiquement dirigés contre les différents antigènes vaccinaux 25 sont réalisées séparément les unes des autres. Il faut donc réaliser plusieurs prélèvements de sérum qui sont analysés séparément, le cas échéant dans plusieurs laboratoires disposant chacun d'une capacité d'analyse d'un seul antigène vaccinal ou bien d'un nombre restreint d'antigènes vaccinaux.

Quelques études mentionnent la détermination d'une partie du statut vaccinal de la personne. Par exemple, une étude de séroprévalence contre les virus des oreillons, de la rougeole, de la rubéole et de la varicelle a été réalisée chez des personnels soignants au Japon dans le cadre d'un programme vaccinal contre ces pathogènes [Asari S. et al. Seroprevalence survey of measles, rubella, varicella and mumps antibodies in health care workers and evaluation of a vaccination program in a tertiary care hospital in Japan; Am. J. Infect. Control. 2003,31 :157-162]. Dans ce travail, un seul prélèvement sanguin a été réalisé, mais les quatre tests sérologiques, bien que réalisés par le même laboratoire, étaient réalisés en utilisant des plaques de micro-titration différentes sur chacune desquelles était fixé un antigène d'un seul agent pathogène et selon des méthodes différentes. Les méthodes ELISA mises en œuvre ne permettaient pas de déterminer le titre des anticorps spécifiques testés. Les méthodes ELISA mises en œuvre impliquaient, en outre, compte tenu de la nature du support solide mise en œuvre, le prélèvement et l'analyse sur des échantillons de volume relativement important de sérum, à savoir un volume nécessaire pour remplir plusieurs puits de microplaques. Ce travail n'a pas permis de déterminer une séroconversion contre les antigènes spécifiques après vaccination chez 20% des personnes vaccinées contre la rougeole et contre la rubéole et chez 50% des personnes vaccinées contre les oreillons, imputable à une sensibilité médiocre des méthodes de détection mises en œuvre. Les différentes méthodes proposées pour la détermination du statut vaccinal impliquent souvent des délais de réponse pour obtenir les résultats supérieurs à 24 heures et, en général, avec une sensibilité et donc une fiabilité médiocres.

Il n'existe pas actuellement de trousse, ni de test automatisé et reproductible, permettant la détermination du statut vaccinal d'une personne par la détermination du titre d'anticorps spécifiques

contre les principaux pathogènes vaccinaux. Ainsi, il n'est pas fourni actuellement de méthode et de kit permettant de déterminer dans un laps de temps inférieur à 24 heures sur un seul prélèvement de sérum, le statut vaccinal d'une personne, c'est-à-  
5 dire la détection ou la détermination des concentrations d'anticorps de classe IgG spécifiques en liaison avec l'ensemble des vaccins actuellement disponibles.

Le but de la présente invention est de fournir une technique de détermination du statut vaccinal d'une personne qui soit simple, 10 rapide et peu coûteuse, utilisable notamment par tout laboratoire pour connaître simultanément par analyse d'un même échantillon de sérum à tester, la concentration d'anticorps contre une pluralité de vaccins actuellement disponibles, et ce sur un volume d'échantillons relativement réduit et donc compatible pour des 15 prélèvements chez l'enfant, y compris le nourrisson.

Plus particulièrement encore, la technique de diagnostic doit pouvoir être automatisable et reproductible de façon fiable, aussi bien dans sa mise en œuvre que dans la préparation des supports solides mis en œuvre.

20 Pour ce faire, la présente invention fournit une méthode de détermination sérologique du statut vaccinal d'un individu par détection, de préférence quantification des anticorps sériques du type IgG spécifiques d'antigènes vaccinaux d'une pluralité d'agents pathogènes du type bactéries, virus, champignons ou parasites, 25 caractérisée en ce que l'on réalise la détection, et de préférence la quantification, d'un complexe de réactions immunologiques entre chaque dit antigène vaccinal et respectivement chaque dit anticorps spécifique dudit antigène vaccinal, éventuellement présents dans un échantillon de sérum humain à tester, en 30 réalisant les étapes de :

1- mise en contact d'un seul et même dit échantillon de sérum à tester avec :

- un même support solide sur lequel est fixée une pluralité de dits antigènes vaccinaux correspondant à une pluralité d'agents 5 pathogènes, dans des zones différentes du support,

- en présence d'au moins une première substance de détection réagissant par complexation avec lesdits anticorps spécifiques et ne réagissant pas avec lesdits antigènes vaccinaux, et

10 2-détection, et de préférence quantification, des complexes résultant de la réaction d'au moins une dite première substance de détection avec desdits anticorps spécifiques complexés auxdits antigènes vaccinaux fixés sur ledit support solide.

De façon connue, après lavage du support solide, on vérifie 15 la présence de dits anticorps spécifiques dans l'échantillon en détectant le signal de l'élément de marquage de ladite substance de détection au niveau du site de fixation de l'antigène vaccinal correspondant audit anticorps spécifique sur le support solide, dans la mesure où ladite substance de détection réagit 20 spécifiquement avec ledit anticorps spécifique et ne réagit pas avec ledit antigène vaccinal.

De façon connue également, la quantification est réalisée par comparaison du signal émis par le complexe de réaction antigène-anticorps-substance de détection du sérum testé avec une courbe 25 de référence obtenue par calibration à l'aide de sérum témoins contenant une concentration connue d'anticorps à détecter.

On entend par »antigène vaccinal », un antigène susceptible de stimuler une réponse immunitaire du patient induisant la production d'anticorps sériques protecteurs, c'est à dire un

anticorps se liant à l'agent pathogène de telle façon que l'organisme se trouve ainsi protégé contre les effets pathogènes dudit agent.

De préférence, dans la méthode selon l'invention, on utilise 5 une même dite première substance de détection pour la détection des différents anticorps spécifiques des différents antigènes vaccinaux.

De préférence encore, et plus particulièrement, on met en œuvre une dite première substance de détection qui est une 10 immunoglobuline anti-IgG, de préférence une immunoglobuline de chèvre ou de poussin.

Dans un mode particulier de réalisation, lesdits antigènes vaccinaux sont des antigènes des agents pathogènes choisis parmi les virus des oreillons, de la rubéole, de la rougeole, de la 15 varicelle, de la poliomyélite, de la fièvre jaune, de l'encéphalite à tique, de l'hépatite A, de l'hépatite B, et les bactéries de la coqueluche *Bordetella pertussis*, du tétanos et de la diphtérie.

Avantageusement, on détermine si la concentration de dit 20 anticorps spécifiques atteint un seuil à partir duquel ledit anticorps spécifique a une action protectrice protégeant contre la maladie déterminée par le pathogène.

Dans certains cas, il est en effet possible de déterminer une concentration d'anticorps spécifiques conférant une protection dans près de 100% des personnes vaccinées, la détermination de 25 cette concentration (ou seuil) est faite par des études séro-épidémiologiques sur de vastes populations.

La présente invention concerne donc plus particulièrement une méthode de diagnostic du statut vaccinal des maladies infectieuses humaines, mais indirecte, qui repose sur la recherche

dans le sérum du patient d'anticorps spécifiques d'un agent vaccinal de l'agent microbien infectieux, à savoir une bactérie, un virus, un parasite ou un champignon responsable d'une pathologie (désignés ci-dessous "microbe").

5        Cette méthode selon l'invention est plus particulièrement avantageuse lorsque qu'au moins un dit antigène vaccinal est un antigène microbien corpusculaire constitué de microbe entier inactivé ou fraction de microbe, notamment un antigène vaccinal sous forme de suspension virale de virus entiers vivants  
10      désactivés.

Les inventeurs ont en effet développé une technologie par laquelle ce type d'antigène particulaire ou corpusculaire peut être fixé sur le support solide par simple dépose et adsorption physique ou liaison physico-chimique avec le support par une méthode de  
15      préparation de support solide selon l'invention comme il sera explicité ci-après. Ces antigènes particulaires ou corpusculaires ont l'avantage d'être particulièrement bien visibles après dépôt sur le support solide et, notamment, lors de la lecture de détection de réactions immunologiques éventuelles.

20       On utilise donc avantageusement, comme antigènes vaccinaux, des antigènes constitués de microbes entiers inactivés ou de fractions ou fragments de microbes comprenant un ou plusieurs antigènes. Il est en effet possible de fragmenter mécaniquement le microbe par agitation mécanique ou par  
25      sonication par exemple ou bien de fragmenter le microbe par un procédé enzymatique afin d'en obtenir une fraction conservant les antigènes qui supportent la réaction sérologique, objet de la présente invention. Les fractions ainsi obtenues sont séparées ou encore purifiées des autres constituant du microbe et de son milieu  
30      de culture par un procédé approprié, par exemple par centrifugation ou par filtration. On parle alors de fraction

antigénique ou d'antigène purifié. Le microbe entier ou une quelconque fraction du microbe est appelé ci-après "antigène particulaire ou corpusculaire" en ce que le microbe entier ou une de ses fractions ne peut pas être mis en solution par dissolution, 5 mais uniquement en suspension dans un fluide approprié.

Les microbes ou leur fraction ainsi déposés sont remarquablement nettement visibles en tant que particules individualisées par observation microscopique à l'aide d'un microscope optique ou d'un microscope électronique par exemple.

10 Techniquement, la sérologie microbienne consiste à détecter dans le sérum du patient une réaction antigène – anticorps dans laquelle l'antigène est représenté par tout ou fraction de l'agent microbien infectieux à détecter et l'anticorps est représenté par les immunoglobulines humaines ou animales spécifiques dudit agent 15 microbien infectieux présentes dans le sérum du patient. Elle peut être quantifiée en testant successivement une série de dilutions croissantes de raison 2 ou de raison 10 du sérum du patient à partir d'une première dilution au 1/16 ou bien au 1/50 du sérum du patient.

20 Classiquement, une méthode de diagnostic sérologique indirecte comporte plus particulièrement le dépôt de l'antigène sur un support solide tel que des microbilles de latex, notamment dans la technique de détection par agglutination dans laquelle des microbilles de latex sont recouvertes par l'antigène microbien à tester, et sont agglutinées les unes aux autres par le sérum de patient présentant des anticorps spécifiques, cette agglutination étant visible à l'œil nu.

30 Toutefois, la technique de détection par test d'agglutination est à la fois peu pratique à mettre en œuvre et peu sensible. Elle implique, en outre, l'utilisation de quantités importantes de réactifs

et du sérum du patient et, enfin, la lecture des résultats n'est pas automatisable.

Selon la méthode de l'invention, on dépose donc, le cas échéant, l'antigène sur un support solide du type lame de verre, ou 5 microplaques de titration pour mettre en oeuvre des techniques de détection par immunodétection, notamment immunofluorescence, ou par technique enzymatique, notamment du type ELISA "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" ou une feuille de nitrocellulose ou de nylon pour les techniques de détection du type Western-blot, 10 dans laquelle les antigènes microbiens séparés par électrophorèse puis transférés sur le support solide (feuille de nitrocellulose ou de nylon) réagissent séparément les uns des autres avec le sérum du patient. Ces techniques de détection sont bien connues de l'homme de l'art, et comprennent les étapes successives de :

15 1. décomplémentation du sérum par chauffage à 56°C pendant 30 minutes,

20 2. mise en contact de l'antigène correspondant à l'agent microbien infectieux fixé sur support solide, avec le sérum du patient puis incubation sous des conditions de temps, de température, d'hygrométrie, d'agitation mécanique et de force ionique du milieu permettant la réaction antigène – anticorps,

3. lavage précautionneux et extensif permettant d'éliminer le sérum du patient non-fixé au support solide, en excès ,

25 4. application d'un anticorps secondaire de détection qui est une immunoglobuline animale dirigée contre les immunoglobulines de l'espèce du patient considéré, par exemple dans le cas d'un patient humain une immunoglobuline de chèvre anti-immunoglobuline humaine conjuguée à une substance fluorochrome, généralement de l'iso-thio-cyanate de fluoresceine

ou une enzyme, généralement une peroxydase et incubation sous des conditions de temps, de température, d'hygrométrie, d'agitation mécanique et de force ionique du milieu permettant la réaction antigène – anticorps,

5 5. lavage précautionneux et extensif permettant d'éliminer l'immunoglobuline marquée, non fixée, en excès,

6. détection d'une réaction par lecture, à l'aide d'un appareillage approprié en fonction du marqueur tel qu'un microscope à fluorescence ou un lecteur de puces biologiques  
10 10 (microarray en anglais) pour la technique d'immunofluorescence indirecte, ou un lecteur de densité optique pour la technique de détection enzymatique du type ELISA. La lecture de la réaction Western-Blot se fait à l'œil nu ou après acquisition numérique du gel et analyse par un logiciel de densitométrie ou tout logiciel  
15 15 approprié pour le traitement des images.

La présente invention concerne plus particulièrement les méthodes de détection et dosage dans lesquelles on détecte la présence et, de préférence, on dose la quantité d'immunoglobulines de classe G (IgG) spécifiques d'un antigène  
20 20 vaccinal caractéristique d'un microbe.

Dans ces méthodes on utilise un anticorps secondaire de détection ou dite première substance de détection marqué par un élément de marquage ou marqueur, en général des immunoglobulines animales dirigées contre les immunoglobulines  
25 25 de l'espèce du patient considéré, par exemple dans le cas d'un patient humain une immunoglobuline de chèvre anti-immunoglobuline humaine anti IgG humaines qui réagissent avec les immunoglobulines spécifiques de classe G complexées au dit antigène vaccinal.

Aucun test sérologique commercialisé actuellement n'inclut systématiquement le contrôle de l'introduction et de la valeur réactive (ou réactivité immunologique) des anticorps secondaires de détection anti IgG mis en œuvre, et un autre but original de la 5 présente invention est donc de fournir un test comprenant ce contrôle de réactivité.

De préférence, dans la méthode selon l'invention, on réalise au préalable le contrôle de la présence et la réactivité de la dite première substance de détection en réalisant les étapes de :

- 10 - mise en contact dudit échantillon à tester avec un support solide, sur lequel a été fixé un premier antigène de contrôle qui est une immunoglobuline non spécifique de classe G, en présence une solution contenant une dite première substance de détection, et
- 15 - vérification si ladite première substance de détection a réagi avec ledit premier antigène de contrôle fixé sur le support solide.

La spécificité de la réaction antigène infectieux/anticorps sérique conditionne la spécificité et la valeur prédictive positive du test sérologique basé sur cette réaction et toute fixation d'un 20 anticorps non-spécifique sur l'antigène microbien limite la spécificité et la valeur prédictive du test sérologique. La présence dans le sérum à tester, d'anticorps anti-nucléaires, est une source de fixation non-spécifique d'anticorps sur l'antigène microbien comme expliqué ci-après.

25 La présence dans le sérum du patient d'anticorps anti-nucléaires limite la spécificité de la réaction antigène microbien-anticorps sériques. Les anticorps anti-nucléaires sont en effet des anticorps du type IgG dirigés de façon non-spécifique contre l'ensemble formé par l'ADN et les protéines nucléaires du

chromosome des cellules eucaryotes et des microbes, appelées histones. Ces anticorps anti-nucléaires se fixent donc de façon non-spécifique sur toute cellule eucaryote y compris les champignons et les parasites et sur tout microbe, bactérie, virus à 5 ADN, parasite ou champignon. Ce phénomène entraîne une réaction positive non-spécifique au cours des tests sérologiques utilisant la détection d'IgG spécifique d'une bactérie, un virus à ADN, un champignon ou un parasite entier ou comprenant des complexes ADN/histones comme antigène microbien à l'aide 10 d'anticorps de détection anti IgG dans un sérum contenant des anticorps anti-nucléaires.

La détection des anticorps anti-nucléaires dans le sérum à tester, réalisée en utilisant une technique d'immunodétection par immunofluorescence, a été décrite [Fritzler M.J. In : *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, Fourth edition, Rose N.R., Conway de Macario E., Fahey J.L., Friedman H., Penn, G.M., (eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1992, pp. 724-729] utilisant des cellules mammifères y compris des cellules humaines telles que des cellules Hep-2 comme antigène. Dans ces 20 conditions, la prévalence des anticorps antinucléaires détectés sur le sérum pur est de 2% dans la population générale, de 20% parmi les parents de patients présentant une polyarthrite rhumatoïde, et de 75% parmi les personnes âgées sans pathologie clinique apparente [Mc Carty G.A., and coll. *Antinuclear antibodies : contemporary techniques and clinical applications to connective tissue diseases*. Oxford University Press, New-York, 1984]. Dans cette méthode, les cellules sont constituées par un tapis de cellules confluentes déposées et « lues » manuellement. Ce dépôt de cellules confluentes est trop visqueux pour être robotisable par 25 dépôt avec un robot de type seringue, et la lecture n'est pas automatisable car, seul, le dépôt manuel permet de déposer une grande quantité de cellules de manière à garantir une détection 30

suffisante de la réaction Cellule-anticorps anti-nucléaires. Dans ces publications, on ne mentionne pas la nécessité de réaliser un contrôle systématique de la présence d'anticorps anti-nucléaires dans des tests d'immunodétection d'antigènes microbiens. En 5 outre, la détection avec des cellules confluentes déposées manuellement sur support solide n'est pas applicable pour des tests de routine de laboratoire.

Il n'y a donc pas de méthode publiée à ce jour, pour le contrôle ou l'élimination des anticorps anti-nucléaires avant la 10 réalisation d'un test sérologique pour le diagnostic des maladies infectieuses de façon à garantir lors du résultat l'absence d'une réaction faussement positive applicable en routine de laboratoire. C'est pourquoi, aucun protocole de sérologie publié dans les manuels de référence ni aucun test sérologique commercialisé 15 n'inclut systématiquement le dépistage d'anticorps anti-nucléaires comme préalable à la réalisation ou à l'interprétation de la sérologie.

En pratique, à ce jour, dans les tests d'immunodétection en routine de laboratoire, on ne peut, tout au plus, détecter les faux 20 positifs dus à la présence d'anticorps anti-nucléaires qu'en effectuant des tests sur une pluralité d'antigènes microbiens dont la présence concomitante n'est pas vraisemblable. Mais, ce type de vérification, on le comprend, augmente considérablement le coût en terme de matériel et main d'œuvre ainsi que la durée des 25 tests.

Pour ce faire, la présente invention fournit une méthode dans laquelle, on contrôle la présence éventuelle d'un anticorps anti-nucléaire dans ledit échantillon à tester en

- mettant en contact ledit échantillon à tester avec

- un support solide sur lequel a été fixé un deuxième antigène de contrôle qui comprend des complexes ADN/histones, de préférence comprenant des noyaux de cellules nucléées de cellules de l'espèce du patient, de préférence encore toute ou 5 partie de cellules d'origine de l'espèce du patient en lignée continue, et
  - en présence d'une dite première substance de détection constituée par un anticorps de marquage qui ne réagit qu'avec une dite immunoglobuline de l'espèce du patient de classe G; et

10 - en vérifiant si ledit deuxième antigène de contrôle fixé sur le support solide réagit avec ladite première substance de détection.

15 Dans le cas d'un patient humain, on peut, notamment, utiliser des cellules de fibroblastes humains non confluentes en suspension, notamment des cellules HL60.

Si l'échantillon à tester comprend des anticorps anti-nucléaires (qui sont des IgG, notamment humaines), ceux-ci peuvent réagir avec ledit deuxième antigène ( $Ag_2$ ) et être détectés par ladite première substance de marquage ( $Ac_1$  anti IgG\*) puisque 20 celle-ci est une substance réagissant avec des IgG de l'espèce du patient, notamment humaines, et former le complexe ( $S-Ag_2-IgG$  anti  $Ag_2$ -  $Ac_1$  anti IgG\*).

Une fois l'absence d'anticorps anti-nucléaire établie, la détection d'une réaction de ladite première substance de marquage 25 avec ledit antigène vaccinal microbien est bien la preuve de la présence d'IgG spécifique du dit antigène vaccinal microbien et de formation d'un complexe ( $S-Agvac-IgG$  antiAgvac- $Ac_1$  anti IgG\*) et non pas d'un complexe faux positif résultant de la réaction des

anticorps anti-nucléaires avec l'antigène microbien selon le complexe (S-Agvac-Ac anti nucl.-Ac<sub>1</sub> anti IgG\*).

De préférence encore, on vérifie la réactivité de ladite première substance de détection introduite dans ledit échantillon 5 de sérum à tester, avant de vérifier l'absence d'anticorps anti-nucléaires dans ledit échantillon.

Si ladite première substance de détection est bien réactive, on doit détecter le complexe suivant (S-IgG<sub>1</sub>-Ac<sub>1</sub> anti IgG\*) avec ledit premier antigène (IgG<sub>1</sub>). Dans ce cas, l'absence de réaction 10 de ladite deuxième substance de détection avec ledit deuxième antigène est bien la preuve de l'absence d'anticorps anti-nucléaires.

Plus particulièrement, le dépôt d'IgG de l'espèce du patient, notamment humaines,  $\gamma$ -spécifique (spécifique de la chaîne gamma 15 des immunoglobulines de l'espèce du patient, notamment humaines) comme dit premier antigène permet de contrôler positivement l'introduction de l'immunoglobuline conjuguée anti-IgG au cours de la réaction sérologique ainsi que sa réactivité immunologique (aspect qualitatif). En effet, cet anticorps conjugué 20 va se fixer également sur le dépôt d'IgG qui sera donc reconnu obligatoirement au cours de la phase de détection des IgG spécifiques de la réaction sérologique.

La présente invention permet donc la détection systématique de d'anticorps anti-nucléaires, dans un sérum utilisé pour un 25 diagnostic sérologique par immunofluorescence indirecte, après le dépôt robotisé d'immunoglobulines de l'espèce du patient, notamment humaines, de classe G (IgG) et de cellules nucléées de l'espèce du patient, notamment humaines, sur le support de la réaction sérologique. De même, le dépôt robotisé 30 d'immunoglobulines de l'espèce du patient, notamment humaines,

IgG permet de contrôler la présence des anticorps secondaires anti-immunoglobulines G de l'espèce du patient, notamment humaines, mis en oeuvre.

Une erreur fréquente dans la réalisation des tests 5 sérologiques, notamment pour les tests sérologiques en batterie réalisés sur un grand nombre de sérums à tester, est due à des défauts dans l'introduction des sérums à tester, notamment par pipetage. Ces erreurs interviennent notamment dans les étapes qui impliquent le déplacement de l'échantillon à tester, notamment par 10 pipetage, certains récipients, notamment contenant le support solide sur lequel est déposé l'antigène à détecter, peuvent ne pas être remplis par inadvertance avec le serum de l'espèce du patient, notamment humaine, à tester. Il est connu que le pipetage de serum est entaché d'un risque d'erreurs de 1%, liée à un problème 15 purement technique par absence de pipetage par la pipette, ou à une erreur humaine par absence de pipetage par inadvertance.

Ces erreurs imposent l'introduction de contrôles dans la réalisation de la réaction. L'incorporation systématique au cours de chaque nouvelle manipulation d'un serum témoin négatif c'est à 20 dire ne contenant pas d'anticorps spécifiques de l'antigène à tester permet d'interpréter les réactions positives. De même, l'incorporation d'un serum témoin positif, c'est à dire contenant l'anticorps spécifique de l'antigène testé à un titre connu permet de vérifier la qualité de l'antigène et de l'immunoglobuline conjuguée.

25 Cependant, il n'existe actuellement aucun contrôle fiable de ce que le serum à tester a bien été introduit dans le test sérologique. Or, si par inadvertance, le serum à tester n'est pas introduit dans le test sérologique, la réaction antigène bactérien-anticorps sérique n'existera certainement pas, et le test sera 30 interprété, faussement, comme négatif (faux-négatif). Dans la présente invention, on tire partie de ce que la protéine A du

*Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré) présente une affinité pour les sérums d'origine animale, notamment le cheval, les bovins, le cochon, le lapin, le cobaye, la souris ; à un moindre degré le hamster, le rat et le mouton. En revanche, le sérum de 5 poussin et de chèvre ne réagissent pas avec la protéine A. La protéine A est un polypeptide de 42 kDa, et est un constituant de la paroi des souches de *Staphylococcus aureus*, des protéines similaires mais différentes sont caractérisées à la surface des bactéries du genre *Streptococcus* [Langone J.J. Adv. Immunol. 10 1982, 32 : 157-251]. Cette propriété de la protéine A de *Staphylococcus aureus*, a déjà été utilisée dans un test sérologique chez l'homme pour le diagnostic sérologique des endocardites infectieuses [Rolain JM, Lecam C, Raoult D. Simplified serological diagnosis of endocarditis due to *Coxiella burnetii* and *Bartonella*. Clin. Diag. Lab. Immunol. 2003 ; 10 :1147-15].

La présente invention comprend donc l'introduction d'un contrôle d'introduction du sérum à tester au cours des réactions de sérologies.

20 Pour ce faire, qu'on contrôle que ledit échantillon testé contient bien un sérum de l'espèce du patient, en détectant si des immunoglobulines de l'espèce du patient réagissent avec un troisième antigène de contrôle contenant la protéine A d'une bactérie *Staphylocoque aureus*, de préférence en mettant en 25 contact ledit échantillon avec un support solide sur lequel est fixé un dit troisième antigène de contrôle, en présence d'une deuxième substance de détection qui est une substance réagissant avec une immunoglobuline de l'espèce du patient et pas avec ledit deuxième antigène de contrôle, de préférence un anticorps anti-immunoglobuline de l'espèce du patient et ne réagissant pas avec 30 la protéine A.

Dans la mesure où la protéine A réagit avec des immunoglobulines animales et humaines de façon non spécifique, et ce même en cas de pathologie infectieuse importante, il est possible d'utiliser cette protéine A comme contrôle positif de 5 l'introduction d'un sérum de l'espèce du patient, notamment humaine, dans l'échantillon à tester.

Dans un mode de réalisation avantageux, ledit troisième antigène de contrôle est une bactérie entière *Staphylococcus aureus* comprenant la protéine A. On peut plus particulièrement 10 utiliser les bactéries *Staphylococcus aureus* déposées dans les collections publiques telles que les bactéries déposées à l'A.T.C.C. sous le N°29213 et à la C.N.C.M. de l'Institut Pasteur (France) sous le numéro 65.8T comme décrit dans la publication mentionnée 15 ci-dessus [Rolain JM, Lecam C, Raoult D. Simplified serological diagnosis of endocarditis due to *Coxiella burnetii* and *Bartonella*. Clin. Diag. Lab. Immunol. 2003 ; 10 :1147-8].

Par ailleurs, en dehors des souches-types, toute souche bactérienne identifiée comme *Staphylococcus aureus* peut être utilisée comme antigène Ag<sub>1</sub>.

20 Avantageusement encore, on détecte la présence d'un dit produit de la réaction avec une immunoglobuline anti-immunoglobuline de l'espèce du patient qui est une immunoglobuline d'origine animale, de préférence dans le cas d'un patient humain, une immunoglobuline de chèvre ou de poussin.

25 De préférence, ladite substance de détection, de préférence, le cas échéant, ladite deuxième substance de détection, est une immunoglobuline animale, de préférence encore une immunoglobuline de chèvre ou de poussin.

De préférence encore, ladite deuxième substance de détection correspond à ladite première substance de détection et, de préférence, ladite première substance de détection est une immunoglobuline d'origine animale dans le cas d'un patient 5 humain, anti IgG marquée respectivement par deux éléments de marquages différents.

Avantageusement, on réalise successivement les étapes de :

-contrôle de la présence d'un sérum dans l'échantillon à tester et présence ou présence de ladite première substance de 10 détection, et

-contrôle de la présence d'anticorps anti-nucléaire dans l'échantillon à tester.

Avantageusement encore, on détecte et, le cas échéant, on quantifie la dose de dite immunoglobuline de l'espèce du patient de 15 classe G spécifique dudit antigène vaccinal dans l'échantillon à tester, par lecture automatisée de l'intensité du signal émis par ledit élément de marquage à l'aide d'un appareil de lecture approprié audit signal par ledit élément de marquage.

Comme élément de marquage des dites substances de 20 détection, on utilise donc avantageusement un marquage enzymatique, radioactif ou fluorescent, ce dernier type de marquage fluorescent étant préféré, notamment avec de la fluorescéine.

L'expression « marquage radioactif » signifie que l'anticorps 25 porte un isotope radioactif permettant de le doser par comptage de la radioactivité qui lui est associée, l'isotope pouvant être porté soit sur un élément de la structure de l'anticorps, par exemple les résidus de tyrosine constitutifs, soit sur un radical approprié qui lui a été fixé.

L'expression « marquage enzymatique » signifie que l'anticorps spécifique est couplé ou complexé à une enzyme qui, associée à l'emploi de réactifs appropriés, permet une mesure quantitative de cet anticorps spécifique.

5 Le substrat et les réactifs sont choisis de sorte que le produit final de la réaction ou de la séquence de réactions provoquée par l'enzyme et mettant en œuvre ces substances, soit :

10 - ou bien une substance colorée ou fluorescente qui diffuse dans le milieu liquide environnant l'échantillon testé et qui fait l'objet, soit de la mesure finale spectrophotométrique ou fluorimétrique, respectivement, soit d'une évaluation à l'œil ; éventuellement par rapport à une gamme de teintes étalonnées,

15 - ou bien une substance colorée insoluble qui se dépose sur l'échantillon testé et qui peut faire l'objet, soit d'une mesure photométrique par réflexion, soit d'une évaluation à l'œil, éventuellement par rapport à une gamme de teintes étalonnées.

20 Lorsque l'on utilise une substance de détection rendue fluorescente, la fluorescence associée à l'échantillon testé est lue directement sur un appareil approprié capable de détecter le rayonnement à la longueur d'onde d'émission et de le quantifier.

25 Lorsqu'on utilise une sonde radioactive, comme par exemple l'iode 125, la radioactivité associée à l'échantillon testé est complétée dans un compteur gamma selon toute modalité appropriée et par exemple après solubilisation des cellules par une solution alcaline (par exemple une solution de soude) et récupération de la solution contenant la radioactivité à l'aide d'un tampon absorbant.

Lorsque l'on utilise une enzyme comme élément de marquage sur l'anticorps de détection, l'apparition d'un produit coloré ou

fluorescent est obtenue en ajoutant une solution contenant le substrat de l'enzyme et un ou plusieurs réactifs auxiliaires permettant d'obtenir finalement comme produit de réaction, soit un produit coloré soluble dans le milieu, soit un produit coloré insoluble, soit un produit fluorescent soluble, comme cela a été expliqué précédemment. On mesure ensuite le signal lumineux provenant des échantillons ainsi traités, à l'aide de l'appareillage adapté à chaque cas : photomètre en transmission, ou en réflexion ou fluorimètre respectivement. Alternativement, on peut aussi évaluer à l'œil la coloration obtenue, en s'aidant éventuellement d'une gamme de solutions colorées étalonnées.

En utilisant comme enzyme la phosphatase alcaline, le couplage de cette enzyme avec l'anticorps de détection est effectué selon la méthode proposée par Boehringer Mannheim-Biochemica. Les substrats préférentiels de cette enzyme sont le paranitrophénylphosphate pour une lecture fluorométrique ou le bromo-5 chloro-4-umbelliféryl phosphate pour une lecture fluorométrique ou le bromo-5 chloro-4 indolyl-6 phosphate pour obtenir un produit de réaction coloré insoluble. On peut de même utiliser comme enzyme la  $\beta$ -galactosidase dont les substrats préférentiels sont l'orthonitrophényl  $\beta$ -D-galactopyranoside ou le méthyl-4 umbelliféryl  $\beta$ -D-galactopyranoside.

On peut aussi coupler les anticorps de détection à la peroxydase. Dans ce cas; le procédé de couplage est dérivé de celui décrit par M.B. Wilson et P.K. Nakane in *Immunofluorescence and related staining techniques*, W. Knapp, K. Kolubar, G. Wicks ed. Elsevier/North Holland. Amsterdam 1978, p. 215-224.

Les réactifs utilisés pour révéler la peroxydase conjuguée aux anticorps de détection contiennent de l'eau oxygénée, substrat de l'enzyme, et un chromogène approprié par exemple de

l'orthophénylenediamine ou l'acide azino-2-2' bis (éthyl-3 thiazoline sulfonique-6) ou ABTS pour obtenir un produit final de réaction coloré et soluble dans le milieu ou bien la diamino-3,3' benzidine ou l'amin-3 éthyl-9 carbazole ou le chloro-4  $\alpha$ -naphtol 5 pour obtenir un produit final de réaction insoluble, ou bien l'acide parahydroxyphénol propionique pour obtenir un produit de réaction fluorescent soluble dans le milieu.

L'acétylcholinestérase est couplée à l'anticorps en utilisant préférentiellement un procédé dérivé de celui décrit dans le brevet 10 français n°2 550 799 ou un procédé qui comporte schématiquement la préparation de fragments de l'anticorps par une technique connue, la modification de l'enzyme par réaction avec un agent hétérobifonctionnel approprié et enfin le couplage des produits ainsi obtenus. D'autres procédés connus de construction de 15 conjugués immunoenzymatiques peuvent aussi être utilisés dans ce cas.

La révélation de l'activité enzymatique spécifiquement liée à l'antigène reconnu par le conjugué à l'acétylcholinestérase est réalisée de préférence selon la technique bien connue qui emploie 20 l'acéthylthiocholine comme substrat de l'enzyme et le réactif d'Ellman, ou acide dithio-5,5' nitro-2 benzoïque comme chromogène, selon toute variante adaptée au cas examiné, par exemple celle décrite par Pradelles et al., dans Anal. Chem. 1985, 57 :1170-1173.

25 Dans un mode de réalisation, un protocole de succession des contrôles est le suivant :

1) On vérifie que ledit troisième antigène de contrôle contenant la protéine A réagit avec une des substances de détection. A défaut, on arrête le test, c'est-à-dire on ne prend pas 30 en compte cet échantillon.

2) Si ledit premier antigène de contrôle ( $IgG_1$ ) ne réagit pas avec ladite première substance de détection ( $Ac_1$  anti  $IgG^*$ ), ladite première substance de détection n'est pas présente ou pas réactive. On ne prend pas en compte le résultat du test concernant 5 la détection des IgG spécifiques de l'antigène microbien.

3) Si ledit premier antigène de contrôle ( $IgG_1$ ) réagit avec la première substance de détection, on peut continuer le test, c'est-à-dire prendre en compte les résultats sous réserve des vérifications suivantes concernant les réactions avec les antigènes de contrôle.

10 4) Si ledit deuxième antigène de contrôle contenant un complexe ADN/histone réagit avec ladite première substance de détection, des anticorps antinucléaires sont présents et on ne prend pas en compte les tests de détection et de quantification des IgG spécifiques.

15 5) Si ledit deuxième antigène ne réagit pas, et que ladite première substance de détection est présente et réactive, il n'y a pas d'anticorps anti-nucléaire, et on peut continuer sous réserve de la vérification suivante.

En résumé, on ne prend en compte le résultat de la réaction 20 avec ledit antigène vaccinal microbien, que si les conditions cumulatives suivantes sont réunies :

- ledit premier antigène de contrôle réagit avec ladite première substance de détection, et
- ledit deuxième antigène de contrôle ne réagit pas, et

25 - ledit troisième antigène de contrôle réagit avec ladite première substance de détection.

Dans un mode préféré de réalisation, pour chaque détection et, le cas échéant, quantification d'un dit antigène vaccinal, on réalise les mesures suivantes :

- 1- une première mesure d'une première valeur représentative de la quantité d'un premier élément de marquage de préférence la première valeur de l'intensité d'un signal émis par ledit premier élément de marquage, de préférence encore fluorescent, ledit premier élément de marquage se fixant de manière non spécifique sur toute protéine dans la zone de dépôt dudit antigène vaccinal, et
- 10 2- une deuxième mesure d'une deuxième valeur représentative de la quantité d'un deuxième élément de marquage différent dudit premier élément de marquage et émettant un signal différent, de préférence une deuxième valeur de l'intensité du signal émis par ce deuxième élément de marquage, de préférence encore fluorescent à une longueur d'onde d'excitation différente de celle dudit premier élément de marquage fluorescent, ledit deuxième élément de marquage étant l'élément de marquage de ladite première substance de détection dudit antigène vaccinal, dans la zone de dépôt dudit antigène, et
- 20 3- on calcule le rapport desdites première et deuxième valeurs, et
- 25 4- on compare la valeur dudit rapport à celle d'un rapport de référence obtenu avec une collection de sérums de référence positifs et négatifs, permettant ainsi par comparaison de déterminer la nécessité ou non de vacciner la personne pour ledit antigène vaccinal selon la valeur du rapport desdites première et deuxième valeurs.

La présente invention fournit également une trousse de diagnostic utile pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'invention, caractérisée en ce qu'elle comprend :

5 -un dit même support solide sur lequel est fixé au moins une dite pluralité d'antigènes vaccinaux et le cas échéant au moins un dit antigène de contrôle, et

- des réactifs tels qu'une dite première substance de détection et si nécessaire des réactifs utiles pour la détection dudit élément de marquage.

10 De préférence, la trousse comprend :

-un même dit support solide sur lequel sont fixés au moins un dit antigène vaccinal corpusculaire et lesdits premiers ,deuxième et troisième antigènes de contrôle, et

-une même dite première substance de détection.

15 Avantageusement, dans les méthodes et trousse de diagnostic selon l'invention, on utilise comme support solide une lame de verre ou en plastique, un tube de titrage ou un puits d'une plaque de microtitrage en plastique, et plus particulièrement, comme support solide, on peut utiliser tout dispositif adapté à la 20 manipulation de suspensions cellulaires et bactériennes et notamment des tubes, des lames de verre ou de polymères, des tubes « bijoux » ou des plaques rigides de microtitration en polyéthylène, polystyrène, chlorure .

25 Pour la mise en œuvre de la détermination du statut vaccinal selon la présente invention, il est possible de prélever le sérum par une ponction veineuse à l'aiguille ou bien par prélèvement de sang capillaire, notamment à partir du lobe de l'oreille, de la pulpe du doigt, du talon, couplé à un recueil sur un disque de papier filtre ou

de préférence directement dans un tampon permettant l'élution du sérum.

Selon une autre caractéristique avantageuse de la présente invention, on réalise, après un prélèvement de sang capillaire dans 5 un tube capillaire permettant de recueillir un volume connu de sang total, le recueil dudit échantillon dans un flacon contenant un volume connu d'un tampon d'élution. Cette modalité de recueil originale présente comme avantages sa rapidité (les recueil, élution, et dilution se faisant en une minute). Le fait que le sérum 10 est dilué à une concentration connue, notamment de 1/20 à 1/100, est une sécurité de manipulation vis à vis du risque d'accidents d'exposition au sang tels que transmission de virus et autres pathogènes sanguins pour le préleveur.

Par ailleurs, la présente invention permet la détermination du 15 statut vaccinal de la personne contre plusieurs simultanément contre plusieurs antigènes vaccinaux, sur un seul échantillon de sérum prélevé par ponction capillaire, dans un laps de temps inférieur à 2 heures.

Avantageusement, on recueille un volume déterminé de sang 20 total à l'aide d'un tube capillaire dans un flacon contenant un volume déterminé d'un tampon permettant l'élution du sérum, le sérum étant alors de préférence dilué à une concentration déterminée, de préférence de 1/100 à 1/20, et l'on dépose un volume déterminé de sérum ainsi dilué sur les différentes zones de 25 dépôt desdits antigènes de contrôle et antigènes vaccinaux sur ledit support solide.

Quelque soit le mode de recueil du sang, « prise de sang » ou « ponction capillaire », il convient dans un premier temps de séparer le sérum des globules sanguins .Dans le cas de la 30 ponction capillaire, cette séparation est réalisée par une élution

par un tampon d'élution, et c'est la produit de cette élution qui est mis en contact avec la lame.

Et avantageusement donc, la trousse selon l'invention comprend un flacon comportant un volume déterminé d'un tampon 5 d'élution pour le recueil d'un volume déterminé d'un échantillon de sérum à tester.

On connaît des méthodes et kit de diagnostic impliquant l'utilisation d'un support solide sur lequel sont fixés de façon covalente des protéines solubles, mais ces couplages chimiques 10 covalents sont complexes et coûteux à réaliser. On a proposé la fixation non covalente de protéine soluble ou antigène particulaire sur support solide par adsorption physique ou physico-chimique sur le support, dans le cadre des protocoles de tests d'immunodétection sur support solide, mais la stabilité de la 15 fixation est insuffisante. Une difficulté tient à ce qu'il est nécessaire de bien laver préalablement le support solide pour éliminer les résidus d'éléments de marquage pouvant interférer avec la lecture des résultats alors que ces lavages rendent l'adsorption physique des substances sur le support solide trop 20 instable. Une autre difficulté tient à ce qu'il n'est pas possible de déposer, avec des robots de dépôts, des antigènes corpusculaires tel quels, qu'il s'agisse de cellules ou bactéries entières ou partielles comme mentionné ci-dessus.

Un autre but de la présente invention est donc de fournir un 25 test fiable d'immunodétection d'antigènes vaccinaux microbien, notamment d'antigènes vaccinaux viraux particulaires, par une méthode et des outils simples à mettre en œuvre et réaliser pour une application en routine de laboratoire dans le cadre de la réalisation des tests en série notamment.

Un autre but de la présente invention est de fournir une méthode de préparation de support solide permettant un dépôt robotisé sur le support, d'antigènes de contrôle ou vaccinaux particulaires ou corpusculaires, ainsi que la lecture automatisée 5 des résultats de réaction immunologique desdits antigènes fixés sur support solide dans un test de sérum de patient impliquant une réaction de sérologie microbienne des IgG spécifiques par adsorption avec l'antigène vaccinal ou antigène de contrôle particulaire ou corpusculaire déposé sur support solide.

10 La présente invention fournit une méthode de préparation d'un support solide utile dans une méthode ou une trousse selon l'invention, caractérisé en ce que l'on dépose et fixe par adsorption physique sur ledit support solide une pluralité de dits antigènes vaccinaux comprenant au moins un antigène vaccinal corpusculaire 15 sous forme de suspension de microbes entiers ou fraction de microbes, de préférence un antigène vaccinal sous forme de virus entier vivant désactivé, et, le cas échéant, des dits antigènes de contrôle sous forme de suspension de corpuscules de cellules non confluentes ou bactéries entières ou fraction de cellules ou 20 bactéries, lesdits antigènes corpusculaires étant de préférence déposés par un robot de dépôt comprenant de préférence encore une seringue.

De préférence, lesdits antigènes corpusculaires vaccinaux et/ou de contrôle, sont associés à un colorant, de préférence un 25 colorant fluorescent, sous forme de suspension à une concentration permettant leur visualisation après dépôt à l'aide dudit colorant, permettant de vérifier la fixation desdits antigènes sur le support solide.

Selon la présente invention, les inventeurs ont mis au point, 30 après de nombreux essais infructueux, des conditions de dépôt robotisé d'antigènes vaccinaux microbiens corpusculaires (microbe

entier inactivé ou fraction de microbe entier inactivé) en suspension dans un milieu de dépôt. En effet, actuellement, on dépose sur support solide, par les robots de dépôt, uniquement des solutions homogènes d'une ou de plusieurs molécules. Pour ce faire, la concentration de ces antigènes corpusculaires est calibrée avant dépôt par comptage des particules microbiennes inactivées par « fluorescence activated cell sorting (FACS-scann) puis déposés de façon robotisée sur un support solide. La mise au point de ces dépôts calibrés et robotisés comporte la détermination par des essais, de la concentration optimale pour chacun des antigènes testés, les concentrations infra-optimales donnant des dépôts indétectables, les concentrations supra-optimales entraînant une sédimentation des antigènes corpusculaires de forte densité et de dimensions micrométriques tels que les bactéries entières ou fractionnées en cours de dépôt et donc une variation sensible de la quantité d'antigène déposé. Enfin, les dépôts d'antigènes corpusculaires comportant de l'ADN microbien (bactérie, virus, parasites ou champignons microscopiques sont calibrés par application d'un colorant de préférence fluorescent, notamment une molécule comme l'AMCA qui se fixe de façon non spécifique aux protéines contenues dans l'antigène ou une molécule intercalante qui se fixe de façon non spécifique à l'ADN par intercalation dans la double hélice. Cette dernière méthode est utilisée de préférence pour marquer les cellules utilisées comme témoin sur les lames. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont avantageusement choisies en fonction de celles utilisées par le fluorochrome marquant les immunoglobulines de détection. Ce marquage fluorescent, non spécifique des antigènes peut être réalisé avant leur dépôt par le robot de dépôt ou après celui-ci. Le marqueur fluorescent est avantageusement choisi pour sa stabilité à la lumière du jour.

Plus particulièrement, dans la méthode de préparation de support solide selon l'invention, les antigènes de contrôle sous forme de suspension de cellules sont calibrés à une concentration de  $10^7$  à  $10^9$  cellules/ml, les suspensions de bactéries ou fractions de bactéries à une concentration de  $10^7$  à  $10^9$  particules/ml et les suspensions de virus entiers à une concentration de  $10^9$  à  $10^{10}$  particules/ml.

Avantageusement, on dépose lesdits antigènes de contrôle et vaccinaux corpusculaires en mélange avec un liant protéique, stabilisant la fixation sur ledit support solide.

Plus particulièrement, ledit liant protéique est choisi parmi le mélange organique complexe formé par le jaune d'œufs, de la gélatine, de l'albumine de sérum de bovin ou une IgG polyclonale non humaine, de préférence de chèvre.

Ces liants protéiques fonctionnent comme une colle biologique dudit antigène sur le support solide;

Les différents liants ont été testés sur lame de verre et on a déterminé les concentrations optimales de mise en œuvre. On peut notamment utiliser l'albumine sérique bovine à une concentration finale (volume pour volume) de 1 à 5%, une suspension de jaune d'œuf à une concentration finale de 1 à 10% et ladite IgG caprine à une concentration finale de 25 à 75%.

Les auteurs ont remarqué au cours de différents essais réalisés, que certains antigènes liés par de l'œuf ou de l'albumine bovine étaient lavés lors des étapes de lavage mais que les immunoglobulines humaines IgG introduites comme contrôle restaient invariablement fixées sur la lame de verre. Les inventeurs en ont déduit que les immunoglobulines de classe G se fixaient à la lame de verre d'une façon telle qu'elles supportaient les étapes

de lavage et ont formé l'hypothèse que ces IgG permettraient donc de fixer également sous des conditions appropriées certains antigènes vaccinaux. Les inventeurs ont donc utiliser des IgG d'une autre espèce que l'homme, afin de ne pas interférer dans les 5 tests sérologiques et les auteurs ont ainsi déterminé les propriétés remarquables des IgG de chèvre à titre de colle biologique permettant de fixer les antigènes particulaires, notamment les antigènes vaccinaux particulaires ou corpusculaires.

De préférence et plus particulièrement, ledit antigène 10 vaccinal corpusculaire est déposé sur ledit support solide constitué d'une lame de verre, en mélange avec une immunoglobuline de type IgG polyclonale de chèvre.

La présente invention a également pour objet une méthode de préparation d'un support solide sur lequel est fixé au moins un 15 antigène choisi parmi un dit antigène vaccinal, un dit premier et, le cas échéant, un dit deuxième, troisième ou quatrième antigène permettant une détection par lecture automatisée à l'aide d'une dite première et, le cas échéant, deuxième substance de détection, utile dans une méthode selon l'invention ou une trousse selon 20 l'invention, caractérisée en ce que l'on réalise un lavage préalable du dit support solide avec une solution d'un mélange éthanol/acétone, de préférence à 50/50, puis on dépose et on stabilise la fixation des dits antigènes par adsorption physique sur ledit support solide par un traitement avec de l'alcool, de 25 préférence méthanol ou éthanol, alcool que l'on élimine ensuite et, de préférence, on vérifie la fixation des dits antigènes par coloration, notamment par un marquage fluorescent non spécifique des protéines ou de l'ADN tel qu'explicité ci-dessus.

Cette solution de prélavage permet de nettoyer le support de 30 toute trace de substance de détection ou autre résiduelle et, notamment, éliminer toute fluorescence, tout en conservant la

faculté d'adsorption physique du support vis à vis des dits antigènes déposées ensuite.

Le traitement de stabilisation à l'alcool permet de stabiliser la fixation par adsorption physique aussi bien des protéines, telles 5 que IgG, que des antigènes particulaires.

La détermination du lavage préalable approprié du support solide, notamment de la lame de verre a donné lieu à de nombreux essais. Ce traitement a pour objectif de nettoyer parfaitement ce support pour éliminer les artéfacts fluorescents tout en préservant 10 la fixation ultérieure des antigènes de façon compatible avec leur mode de conservation mais, aussi, en préservant sinon l'intégrité au moins la réactivité immunologique des antigènes. Il a été montré, après de nombreuses recherches infructueuses, que le rinçage et le nettoyage des lames en phase aqueuse ne 15 permettraient pas une fixation ultérieure des antigènes à déposer ; il en allait de même pour le rinçage à base de molécules tensio-actives comme le Tween 20. Le nettoyage avec des alcools n'était pas suffisant pour retirer la plupart des artéfacts fluorescents. C'est donc au terme de ces multiples essais qu'a été optimisé un 20 protocole de nettoyage de support solide, notamment de la lame de verre, par un mélange éthanol 50 % - acétone 50 % puis séchage à l'air.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière des exemples qui vont suivre.

25 Exemple 1 : Dépôt de dits deuxième et troisième antigènes de contrôle sur support solide.

Les cellules HL60 (N° ATCC CCL 240) sont des cellules fibroblastiques humaines en lignée continue utilisées pour la détection des anticorps anti-nucléaires. Après culture et production

selon les protocoles habituels, on a quantifié la concentration des cellules HL 60 à l'aide d'un compteur de cellules (Microcytes® BPC / Yeast, BioDETECT AS, Oslo, Norvège) et cette concentration a été rapportée à  $10^8$  cellules / mL dans un tampon BPS stérile, pH= 5 7,4 pour obtenir une suspension de cellules non confluentes pouvant être déposées par robot de dépôt.

10 *Staphylococcus aureus* (n° de dépôt ATCC 29213) a été cultivé sur gélose à 5% de sang de mouton, puis récolté dans un tampon PBS stérile contenant 0,1% d'azide de sodium. L'inoculum a été mesuré à l'aide du même compteur de cellules et calibré à 10<sup>9</sup> bactéries/mL qui est la concentration optimum compte tenu des contraintes d'absence de sédimentation en cours de dépôt et d'un dépôt en quantité suffisante de particules staphylococciques puis conservé par congélation à - 80°C.

15 On a déposé ces cellules HL60 et des bactéries *Staphylococcus aureus* à une concentration de 10<sup>9</sup> CFU/mL déterminée par FACS-scan (Microcytes®) des lames en verre (Référence LLR2-45, CML, Nemours, France). Les cellules et les bactéries ont été déposées sur le support solide à l'aide d'un robot 20 de dépôt (Arrayer 427™, Affymetrix, MWG Biotech SA, Courtaboeuf, France). Les dépôts ont été séchés à l'air pendant 30 minutes dans l'enceinte du "spotter", puis fixés dans un bain de méthanol à 100 % pendant 10 minutes, puis séchés à nouveau à l'air libre. L'efficacité du dépôt robotisé sur les lames, après la 25 fixation à l'éthanol et après les bains nécessités par la réaction d'immunofluorescence indirecte suivante, a été vérifiée avec succès par la coloration par le colorant fluorescent Hoescht 333-42 (molécule intercalante qui s'intercale dans l'ADN) qui est excité à 350 nanomètres et qui émet à 460 nanomètres (Molecular Probes).

30 Exemple 2 : dépôt de dit premier antigène de contrôle (IgG) sur support solide

Des immunoglobulines humaines de classe G  $\gamma$ -spécifiques (IgG) (Serotec, Cergy Saint-Christophe, France) diluées à une concentration de 5mg/mL pour obtenir des spots bien homogènes, ont été déposées de façon robotisée à l'aide d'un robot de dépôt 5 (modèle 427, Arrayer, Affymetrix, Inc., CA) sur un support solide constitué d'une lame de verre (Référence LLR2-45, GML, Nemours, France).

Les dépôts ont été réalisés par transfert de la suspension d'antigène d'un puit de plaque de microtitration contenant 25  $\mu$ L de 10 suspension, sous un volume de 1 mL déposé, à 25°C et 55 % d'humidité dans l'enceinte du robot de dépôt. Ces conditions ont été contrôlées par un thermo-hygromètre. Les dépôts d'une dimension de 200  $\mu$ m ont été séchés à l'air pendant 30 minutes à 15 37°C dans l'enceinte du robot de dépôt, puis fixés dans un bain d'éthanol à 100% pendant 10 minutes, puis séchés à nouveau à l'air libre. L'efficacité du dépôt robotisé puis de la fixation à l'éthanol après les bains nécessités par la réaction d'immunofluorescence indirecte a été vérifiée par la technique d'immunofluorescence indirecte.

20 10 sérums humains ont été déposés chacun sur un dépôt d'IgG sous trois dilutions chacun, 1 :32, 1 :64 et 1 :128. Après un premier lavage, une réaction d'immunofluorescence indirecte a été réalisée en utilisant une immunoglobuline de chèvre (référence A-21216, Molecular Probes, Eugene, USA) à titre d'anticorps 25 secondaire anti-IgG humaines, couplée à l'Alexa 488 qui est une molécule fluorescente excitée à 488 nanomètres et émettant à 540 nanomètres et en utilisant la même immunoglobuline couplé à l'Alexa 594 (A-21216, Molecular Probes, Eugene, USA) qui est une molécule fluorescente excitée à 594 nanomètres et émettant à 640 30 nanomètres dans une deuxième expérience. La lecture de la réaction a été faite au microscope à fluorescence et a montré une

détection fluorescente dans tous les sérums sous forme d'un spot très brillant pour chacune des 3 dilutions testées et aucune fluorescence dans les sérums ne contenant pas ces facteurs. Cet exemple illustre qu'il est possible de réaliser un dépôt robotisé 5 d'IgG humaines sur un support solide dans des conditions compatibles avec la réalisation d'une réaction d'immunofluorescence indirecte.

Exemple 3 : Détermination du statut vaccinal de personnes.

On a mis au point une lame de verre pour la détermination du 10 statut vaccinal des personnes comportant un total de 8 dépôts d'antigènes comportant 3 dépôts de contrôles et 5 dépôts d'antigènes vaccinaux sur une même lame, répartis en 2 colonnes. Les modalités de dépôt et d'utilisation des 3 dépôts contrôles comportant *Staphylococcus aureus*, IgG et cellules HL-60 ont été 15 exposées dans les exemples 1 et 2 ci-dessus.

Les dépôts d'antigènes vaccinaux ont été réalisés sous forme de suspension virale de virus entiers vivants inactivés déposés à une concentration de  $10^9$  ou  $10^{10}$  particules/ml en mélange avec une IgG caprine à une concentration de 25 à 75% (volume pour 20 volume) et suivant les modalités suivantes :

(1) antigène rubéole : il s'agit de la souche hpv-77 (microbix Biosystems, Inc., Toronto, Ontario, Canada) fournie sous forme d'une suspension virale inactivée à concentration protéique de 0, 51 mg/ml. Cet antigène a été concentré 10 fois par centrifugation 25 avant son dépôt sous un volume de 45  $\mu$ L d'antigène et 5  $\mu$ L d'immunoglobulines IgG de chèvre titrant à 10 mg/ml (référence 15256, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), colorées par 2  $\mu$ L d'amino methyl coumarin acetyl (AMCA) (Molecular Probes, Interchim, Montluçon, France).

L'AMCA se fixe de façon non spécifique aux protéines de cet antigène et permet donc de vérifier le dépôt de l'antigène sur le support solide par adsorption physique. Il est excité à une même longueur d'onde de 350 nm que le colorant HOESCHT 333-42.

5 (2) antigène rougeole : il s'agit de la souche Edmonston (Microbix Biosystems, Inc.) fournie sous forme d'une suspension de particules virales inactivées à une concentration protéique de 1,95 mg/ml qui a été concentrée 5 fois par centrifugation avant son dépôt sous un volume de 45 µL d'antigène et 5 µL 10 d'immunoglobuline IgG de chèvre colorée à l'AMCA.

(3) Antigène oreillons : il s'agit de la souche Enders (société microbix-biosystem incorporated) titrant à une concentration protéique de 1,8 µg/ml et déposée sous un volume de 45 µL d'antigène et 5 µL d'immunoglobuline IgG de chèvre marqués à 15 l'AMCA.

(4) anatoxine diphtérique (référence FA 150934, Aventis Pasteur Vaccins) titrant à une concentration protéique de 18,9 mg/ml et concentrée 10 fois avant son dépôt sous un volume de 45 µL d'antigène et 5 µL d'immunoglobulines IgG de chèvre marquées 20 à l'AMCA,

(5) anatoxine tétanique (référence J001, Aventis Pasteur vaccins) titrant à une concentration de 80 UI/mL et déposée pure sous un volume de 45 µL d'antigène et 5 µL d'immunoglobuline IgG de chèvre marquées à l'AMCA.

25 Les dépôts d'antigènes ont été réalisés sous un volume de 1 nL par un "spotter" de marque Affymetrix®, de modèle Arrayer 427. Après séchage, les lames ainsi préparées ont servi de support à une réaction d'immunofluorescence indirecte pour la détection des

IgG spécifiques des antigènes vaccinaux dans le sérum des personnes selon le protocole suivant :

- dans une première étape, 5 µL de sérum prélevé par ponction veineuse ou par ponction capillaire, sont mis en contact et 5 incubés avec la lame au niveau des différents antigènes vaccinaux et antigènes de contrôles, par un automate d'incubation.

- dans une deuxième étape, l'automate rince la lame afin d'éliminer le sérum testé et réalise une incubation avec l'anticorps de détection anti-IgG humaines conjugué à la fluorescéine qui est 10 excitée à une longueur d'onde de 488 nm (référence Star 106 F, Serotec, France),

- dans une troisième étape, l'automate rince la lame afin d'éliminer l'anticorps de détection conjugué, et sèche la lame,

- dans une quatrième étape, la lame ainsi traitée est retirée 15 de l'automate d'incubation et placée dans la chambre de lecture d'un lecteur automatique de fluorescence. Ce lecteur réalise successivement deux lectures, une à 350 nm qui est la longueur d'onde d'émission du colorant AMCA puis une deuxième lecture à 488 nm qui est la longueur d'onde d'émission de la fluorescéine de 20 l'anticorps de détection,

- dans une cinquième étape, ces données sont transmises à un logiciel afin d'être converties en intensité de fluorescence à 350 nm et à 488 nm pour chacun des dépôts,

- dans un sixième étape, le logiciel analyse les niveaux de 25 fluorescence des contrôles et vérifie successivement

. la présence de fluorescence pour le dépôt *Staphylococcus aureus* pour vérifier la présence du sérum à tester ;

. la présence de fluorescence du dépôt d'IgG pour vérifier la qualité de la réaction impliquant l'anticorps de détection conjugué ;

5 . l'absence de fluorescence du dépôt de cellules HL60 pour vérifier la présence ou l'absence d'anticorps anti-nucléaires dans le sérum à tester.

10 - dans une septième étape, le logiciel calcule le ratio de fluorescence 488/350 pour chacun des dépôts d'antigènes vaccinaux et compare pour chaque dépôt d'antigène vaccinal cette valeur à une courbe de ratio préalablement établie pour chaque antigène vaccinal à l'aide de sérum témoins positifs possédant des anticorps spécifiques à une concentration connue par une méthode de référence et de sérum négatifs ne possédant pas d'anticorps spécifiques détectables par une méthode de référence,

15 La fluorescence à 350 nm qui résulte de l'excitation de marqueurs non-spécifiques qui se fixent de façon non-spécifique soit à l'ADN soit aux protéines des antigènes vaccinaux. La quantité de fluorescence émise par les dépôts d'antigènes à 350 nm est proportionnelle à la quantité d'antigènes effectivement 20 présents dans le dépôt, de sorte que cette fluorescence à 350 nm est une mesure dépendant de la quantité d'antigènes présente dans le dépôt. La quantité de fluorescence à 350 nm est utilisée par le logiciel

25 . d'une part pour repérer la position topographique des dépôts d'antigènes sur la lame et

. d'autre part pour en quantifier la surface exacte et donc les contours afin de ne pas incorporer des artefacts de fluorescence qui seraient situés en dehors de ces spots, et

. enfin, pour pondérer la fluorescence à 488 nm. Cette deuxième longueur d'onde de 488 nm, résulte de l'excitation du marqueur de l'Immunoglobuline G de détection. La quantité de fluorescence à 488 nm est en relation avec la quantité 5 d'Immunoglobuline G spécifique présente dans le spot du sérum du patient à tester. La fluorescence à 488 nm (et donc la fixation des Immunoglobulines G) dépend de la quantité d'antigènes qui ont été déposés. En effet, si l'on dépose très peu d'antigène, la quantité 10 d'Immunoglobuline spécifique fixée va être faible et donc le niveau de fluorescence à 488 va être faible. C'est pourquoi la quantité de fluorescence à 488 nm est pondérée pour chacun des spots d'antigènes vaccinaux par la quantité de fluorescence à 350 nm et le ratio des fluorescences exprimant la quantité d'IgG spécifiques 15 présente dans le sérum testé.

15 - dans une dernière étape, le logiciel interprète par comparaison des ratios de fluorescence 488/350 mesurés avec les sérum 20 testés avec ceux obtenus avec une collection de sérum de références positifs et négatifs pour chacun qui ont permis d'établir les courbes de référence, l'ensemble de ces données pour indiquer la liste des antigènes vaccinaux contre lesquels le 25 sérum testé possède des anticorps spécifiques, et donc le statut vaccinal de la personne.

- Ainsi, dans cet exemple on a testé quatre sérum prélevés chez 25 patients différents pour rechercher la présence d'anticorps de classe IgG contre les antigènes vaccinaux de la rougeole, de la rubéole, des oreillons, de la diphtérie et du tétanos. La valeur seuil du ratio de fluorescence a été déterminée pour chacun de ces 5 antigènes vaccinaux.

- Les Tableaux 1A, 1B, 1C et 1D montrent les ratios de 30 fluorescence pour chacun des 4 sérum testés, respectivement.

La lecture des tableaux 1A à 1C indique que :

- le sérum n°1 est :

. positif pour la présence d'anticorps anti-anatoxine diphtérique (ratio de fluorescence > 1, valeur seuil),

5 . positif pour la présence d'anticorps anti-anatoxine tétanique (ratio de fluorescence > 0,05, valeur seuil),

. négatif pour la présence d'anticorps anti-rubéole (ratio de fluorescence < 0,1, valeur seuil),

10 . positif pour la présence d'anticorps anti-rougeole (ratio de fluorescence > 0,1, valeur seuil), et

. positif pour la présence d'anticorps anti-oreillons (ratio de fluorescence > 0,11, valeur seuil) ;

- le sérum n°2 est :

15 . positif pour la présence d'anticorps anti-anatoxine diphtérique (ratio de fluorescence > 1, valeur seuil),

. positif pour la présence d'anticorps anti-anatoxine tétanique (ratio de fluorescence > 0,05, valeur seuil),

positif pour la présence d'anticorps anti-rubéole (ratio de fluorescence > 0,1, valeur seuil),

20 . positif pour la présence d'anticorps anti-rougeole (ratio de fluorescence > 0,1, valeur seuil), et

. positif pour la présence d'anticorps anti-oreillons (ratio de fluorescence > 0,11, valeur seuil) ;

- le sérum n°3 est :

. négatif pour la présence d'anticorps anti-anatoxine diphtérique (ratio de fluorescence < 1, valeur seuil),

. négatif pour la présence d'anticorps anti-anatoxine tétanique (ratio de fluorescence < 0,05, valeur seuil),

5 . négatif pour la présence d'anticorps anti-rubéole (ratio de fluorescence < 0,1, valeur seuil),

. positif pour la présence d'anticorps anti-rougeole (ratio de fluorescence > 0,1, valeur seuil), et

10 . négatif pour la présence d'anticorps anti-oreillons (ratio de fluorescence < 0,11, valeur seuil) ;

- le sérum n°4 est :

. négatif pour la présence d'anticorps anti-anatoxine diphtérique (ratio de fluorescence < 1, valeur seuil),

15 . négatif pour la présence d'anticorps anti-anatoxine tétanique (ratio de fluorescence < 0,05, valeur seuil),

. positif pour la présence d'anticorps anti-rubéole (ratio de fluorescence > 0,1, valeur seuil),

. négatif pour la présence d'anticorps anti-rougeole (ratio de fluorescence < 0,1, valeur seuil), et

20 . négatif pour la présence d'anticorps anti-oreillons (ratio de fluorescence égale à 0,11, valeur seuil).

- La figure 1 est un schéma indiquant le plan des dépôts d'antigènes sur la lame vaccin.

25 - La figure 2 est l'image de cette lame après incubation avec les 4 sérum cités ci-dessus, obtenue à 350 nm (coloration

fluorescente non spécifique après marquage fluorescent non-spécifique des protéines à l'AMCA et de l'ADN au colorant Hoescht 332-42). Cette image permet de contrôler la présence de chacun des dépôts d'antigène de contrôle et vaccinaux.

5 Sur les figures 1 et 2, apparaît un spot (zone de dépôt) IgM qui n'est pas utile dans les tests réalisés.

Tableau 1A

Sérum N° 1

Numéro	Abscisse	Ordonnée	Surface	Fluorescence 350	Ratio F350/F488	Fluorescence 488
SA	240	127	1228	44238	1,274	56359
IgG	238	195	1198	54695	0,902	49335
Diphthérie	238	263	1203	44069	1,691	74521
Rubéole	235	332	1117	56298	0,075	4222
HL	309	123	452	9652	0,458	4421
IgM	306	197	918	18369	0,183	3362
Tétanos	304	266	842	26512	0,078	2068
Rougeole	303	334	1104	37075	0,13	4820
Oreillon	302	401	1038	29978	0,118	3537

Tableau 1B

Sérum N° 2

Numéro	Abscisse	Ordonnée	Surface	Fluorescence 350	Ratio F488/ F350	Fluorescence 488
SA	249	109	1199	41653	1,839	76600
IgG	250	177	1255	49420	1,263	62417
Diphthérie	251	247	1176	39874	2,350	93704
Rubéole	251	313	1173	50395	0,108	5443
HL	316	106	537	10853	0,627	6805
IgM	318	176	895	15917	0,249	3963
Tétanos	321	244	834	21013	0,357	7502
Rougeole	319	314	1164	39486	0,118	4659
Oreillon	320	382	1079	31342	0,120	3761

**Tableau 1C**

Sérum N° 3

Numéro	Abscisse	Ordonnée	Surface	Fluorescence 350	Ratio F488/F350	Fluorescence 488
SA	210	85	1175	34462	1,981	68269
IgG	210	153	1293	47678	1,561	74425
Diphthérie	210	220	1255	54523	0,342	18647
Rubéole	209	288	1172	49101	0,073	3584
HL	278	78	474	9180	0,740	6793
IgM	278	151	943	15225	0,335	5100
Tétanos	278	220	848	24553	0,046	1129
Rougeole	278	288	1178	34879	0,153	5336
Oreillon	278	357	1123	26949	0,095	2560

**Tableau 1D**

Sérum N° 4

Numéro	Abscisse	Ordonnée	Surface	Fluorescence 350	Ratio F488/F350	Fluorescence 488
SA	240	110	1202	40889	1,093	44692
IgG	240	177	1269	53557	1,123	60145
Diphthérie	242	246	1253	56284	0,316	17786
Rubéole	241	314	1106	43970	0,107	4705
HL	308	106	533	9932	0,797	7916
IgM	308	178	926	17540	0,309	5420
Tétanos	309	244	838	29892	0,049	1465
Rougeole	309	314	1174	41689	0,093	3877
Oreillon	310	382	1044	29666	0,110	3263

## REVENDICATIONS

1. Méthode de détermination sérologique du statut vaccinal d'un individu par détection, de préférence quantification des anticorps sériques du type IgG spécifiques d'antigènes 5 vaccinaux d'une pluralité d'agents pathogènes du type bactéries, virus, champignons ou parasites, caractérisée en ce que l'on réalise la détection, et de préférence la quantification, d'un complexe de réactions immunologiques entre chaque dit antigène vaccinal et respectivement chaque dit anticorps spécifique dudit 10 antigène vaccinal, éventuellement présents dans un échantillon de sérum humain à tester, en réalisant les étapes de :

1- mise en contact d'un seul et même dit échantillon de sérum à tester avec :

- un même support solide sur lequel est fixé une pluralité de 15 dits antigènes vaccinaux correspondant à une pluralité d'agents pathogènes, dans des zones différentes du support,

- en présence d'au moins une première substance de détection réagissant par complexation avec lesdits anticorps spécifiques et ne réagissant pas avec lesdits antigènes vaccinaux, 20 et

2- détection, et de préférence quantification, des complexes résultant de la réaction d'au moins une dite première substance de détection avec desdits anticorps spécifiques complexés auxdits antigènes vaccinaux fixés sur ledit support solide.

25 2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'on utilise une même dite première substance de détection pour la détection des différents anticorps spécifiques des différents antigènes vaccinaux.

3. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'on met en œuvre une dite première substance de détection qui est une immunoglobuline anti-IgG, de préférence une immunoglobuline de chèvre ou de poussin.

5 4. Méthode selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que lesdits antigènes vaccinaux sont des antigènes des agents pathogènes choisis parmi les virus des oreillons, de la rubéole, de la rougeole, de la varicelle, de la poliomyélite, de la fièvre jaune, de l'encéphalite à tique, de 10 l'hépatite A, de l'hépatite B, et les bactéries de la coqueluche *Bordetella pertussis*, du tétanos et de la diphtérie.

15 5. Méthode selon une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'on détermine si la concentration de dit anticorps spécifiques atteint un seuil à partir duquel ledit anticorps spécifique a une action protectrice protégeant contre la maladie déterminée par le pathogène.

20 6. Méthode selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'on contrôle la présence et la réactivité de la dite première substance de détection en réalisant les étapes de :

- mise en contact dudit échantillon à tester avec un support solide, sur lequel a été fixé un premier antigène de contrôle qui est une immunoglobuline non spécifique de classe G, en présence une solution contenant une dite première substance de détection, et

25 - vérification si ladite première substance de détection a réagi avec ledit premier antigène de contrôle fixé sur le support solide.

7. Méthode selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'on contrôle la présence éventuelle d'un anticorps anti-nucléaire dans ledit échantillon à tester, en

- mettant en contact ledit échantillon à tester avec

5       •     un support solide sur lequel a été fixé un deuxième antigène de contrôle qui comprend des complexes ADN/histones, de préférence comprenant des noyaux de cellules nucléées de cellules de l'espèce du patient, de préférence encore toute ou partie de cellules d'origine de l'espèce du patient en lignée 10 continue, et

•     en présence d'une dite première substance de détection constituée par un anticorps de marquage qui ne réagit qu'avec une dite immunoglobuline de l'espèce du patient de classe G; et

15       - en vérifiant si ledit deuxième antigène de contrôle fixé sur le support solide réagit avec ladite première substance de détection.

8. Méthode selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'on contrôle que ledit échantillon testé contient bien un sérum de l'espèce du patient, en détectant si des 20 immunoglobulines de l'espèce du patient réagissent avec un troisième antigène de contrôle contenant la protéine A d'une bactérie *Staphylocoque aureus*, de préférence en mettant en contact ledit échantillon avec un support solide sur lequel est fixé un dit troisième antigène de contrôle, en présence d'une deuxième 25 substance de détection qui est une substance réagissant avec une immunoglobuline de l'espèce du patient et pas avec ledit deuxième antigène de contrôle, de préférence un anticorps anti-immunoglobuline de l'espèce du patient et ne réagissant pas avec la protéine A.

9. Méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit troisième antigène de contrôle est une bactérie *Staphylococcus* entière comprenant la protéine A.

10. Méthode selon la revendications 8 ou 9, caractérisée en 5 ce qu'on réalise successivement les étapes de :

-contrôle de la présence d'un sérum dans l'échantillon à tester et présence ou présence de ladite première substance de détection, et

-contrôle de la présence d'anticorps anti-nucléaire dans 10 l'échantillon à tester.

11. Méthode selon la revendication 9 ou 10, caractérisée en ce que ladite deuxième substance de détection est une immunoglobuline animale, de préférence encore une immunoglobuline de chèvre ou de poussin.

15 12. Méthode selon l'une des revendications 9, 10 ou 11, caractérisée en ce que ladite deuxième substance de détection est identique à ladite première substance de détection, mais de préférence avec un élément de marquage différent.

20 13. Méthode selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que ladite substance de détection est une immunoglobuline d'origine animale anti-IgG de préférence, une immunoglobuline de chèvre ou de poussin, de préférence un anticorps conjugué à un élément de marquage qui est une substance fluorescente.

25 14. Méthode selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce qu'au moins un dit antigène vaccinal est un antigène microbien corpusculaire constitué de microbe entier inactivé ou fraction de microbe, de préférence fixé sur le support

solide par simple dépose et adsorption physique ou liaison physico-chimique avec le support.

15. Méthode selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisée en ce qu'on utilise comme support solide, une lame de 5 verre ou en plastique, un tube de titrage ou un puit d'une plaque de micro-titrage en plastique.

16. Méthode selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que l'on détecte et, le cas échéant, on quantifie 10 la dose de dite immunoglobuline de l'espèce du patient de classe G spécifique dudit antigène vaccinal dans l'échantillon à tester, par lecture automatisée de l'intensité du signal émis par ledit élément de marquage à l'aide d'un appareil de lecture approprié audit signal par ledit élément de marquage.

17. Méthode selon l'une des revendications 1 à 16, 15 caractérisé en ce que l'on recueille un volume déterminé de sang total à l'aide d'un tube capillaire dans un flacon contenant un volume déterminé d'un tampon permettant l'élution du sérum, le 20 sérum étant alors de préférence dilué à une concentration déterminée, de préférence de 1/100 à 1/20, et l'on dépose un volume déterminé de sérum ainsi dilué sur les différentes zones de dépôt desdits antigènes de contrôle et antigènes vaccinaux sur ledit support solide.

18. Méthode selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que, pour chaque détection et, le cas échéant, 25 quantification d'un dit antigène vaccinal, on réalise les mesures suivantes :

1- une première mesure d'une première valeur représentative de la quantité d'un premier élément de marquage de préférence la première valeur de l'intensité d'un signal émis par ledit premier

élément de marquage, de préférence encore fluorescent, ledit premier élément de marquage se fixant de manière non spécifique sur toute protéine dans la zone de dépôt dudit antigène vaccinal, et

2- une deuxième mesure d'une deuxième valeur  
5 représentative de la quantité d'un deuxième élément de marquage différent dudit premier élément de marquage et émettant un signal différent, de préférence une deuxième valeur de l'intensité du signal émis par ce deuxième élément de marquage, de préférence encore fluorescent à une longueur d'onde d'excitation différente de  
10 celle dudit premier élément de marquage fluorescent, ledit deuxième élément de marquage étant l'élément de marquage de ladite première substance de détection dudit antigène vaccinal, dans la zone de dépôt dudit antigène, et

3- on calcule le rapport desdites première et deuxième  
15 valeurs, et

4- on compare la valeur dudit rapport à celle d'un rapport de référence obtenu avec une collection de sérums de référence positifs et négatifs, permettant ainsi par comparaison de déterminer la nécessité ou non de vacciner la personne pour ledit  
20 antigène vaccinal selon la valeur du rapport desdites première et deuxième valeurs.

19. Trousse utile pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisée en ce qu'elle comprend :

25 - un dit même support solide sur lequel est fixé au moins une dite pluralité d'antigènes vaccinaux et le cas échéant au moins un dit antigène de contrôle, et

- des réactifs tels qu'une dite première substance de détection et si nécessaire des réactifs utiles pour la détection dudit élément de marquage.

20. Trousse selon la revendication 19, caractérisée en ce 5 qu'elle comprend :

-un même dit support solide sur lequel sont fixés au moins un dit antigène vaccinal corpusculaire et les dits premiers ,deuxième et troisième antigènes de contrôle, et

-une même dite première substance de détection.

10 21. Trousse selon la revendication 19 ou 20, caractérisé en ce qu'elle comprend un flacon comportant un volume déterminé d'un tampon d'élution pour le recueil d'un volume déterminé d'un échantillon de sérum à tester.

15 22. Méthode de préparation d'un support solide utile dans une méthode ou une trousse selon l'une des revendications 1 à 21, caractérisé en ce que l'on dépose et fixe par adsorption physique sur ledit support solide une pluralité de dits antigènes vaccinaux comprenant au moins un antigène vaccinal corpusculaire sous forme de suspension de microbes entiers ou fraction de microbes, 20 de préférence un antigène vaccinal sous forme de virus entier vivant désactivé, et, le cas échéant, des dits antigènes de contrôle sous forme de suspension de corpuscules de cellules non confluentes ou bactéries entières ou fraction de cellules ou bactéries, lesdits antigènes corpusculaires étant de préférence 25 déposés par un robot de dépôt comprenant de préférence encore une seringue.

23. Méthode selon la revendication 22, caractérisé en ce que lesdits antigènes corpusculaires vaccinaux et/ou de contrôle, sont associés à un colorant, de préférence un colorant fluorescent,

sous forme de suspension à une concentration permettant leur visualisation après dépôt à l'aide dudit colorant, permettant de vérifier la fixation desdits antigènes sur le support solide.

24. Méthode selon la revendication 23, caractérisée en ce  
5 que les antigènes de contrôle sous forme de suspension de cellules sont calibrés à une concentration de  $10^7$  à  $10^9$  cellules/ml, les suspensions de bactéries ou fractions de bactéries à une concentration de  $10^7$  à  $10^9$  particules/ml et les suspensions de virus entiers à une concentration de  $10^9$  à  $10^{10}$  particules/ml.

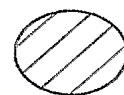
10 25. Méthode selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisée en ce que l'on dépose lesdits antigènes de contrôle et vaccinaux corpusculaires en mélange avec un liant protéique, stabilisant la fixation sur ledit support solide.

15 26. Méthode selon la revendication 25, caractérisée en ce que ledit liant protéique est choisi parmi du jaune d'œufs, de la gélatine, de l'albumine de sérum de bovin ou une IgG polyclonale non humaine, de préférence de chèvre.

20 27. Méthode selon la revendication 26, caractérisée en ce que ledit antigène vaccinal corpusculaire est déposé sur ledit support solide constitué d'une lame de verre, en mélange avec une immunoglobuline de type IgG polyclonale de chèvre.

25 28. Méthode selon l'une des revendications 22 à 27, caractérisée en ce que l'on réalise un lavage préalable dudit support dudit support solide avec une solution d'un mélange éthanol/acétone, de préférence à 50-50, puis on dépose et on stabilise la fixation des dits antigènes par adsorption physique sur ledit support solide par un traitement avec de l'alcool, de préférence méthanol ou éthanol, alcool que l'on élimine ensuite et, de préférence encore, on vérifie la fixation desdits antigènes par coloration, de préférence par un marquage fluorescent non spécifique des protéines ou de l'ADN.

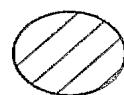
1/2



Staphylococcus aureus



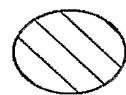
Cellules HL60



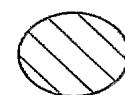
IgG



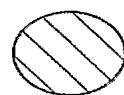
IgM



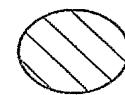
Anatoxine diphtérique



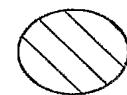
Anatoxine tétanique



Rubéole



Rougeole



Oreillon

FIG.1



2/2

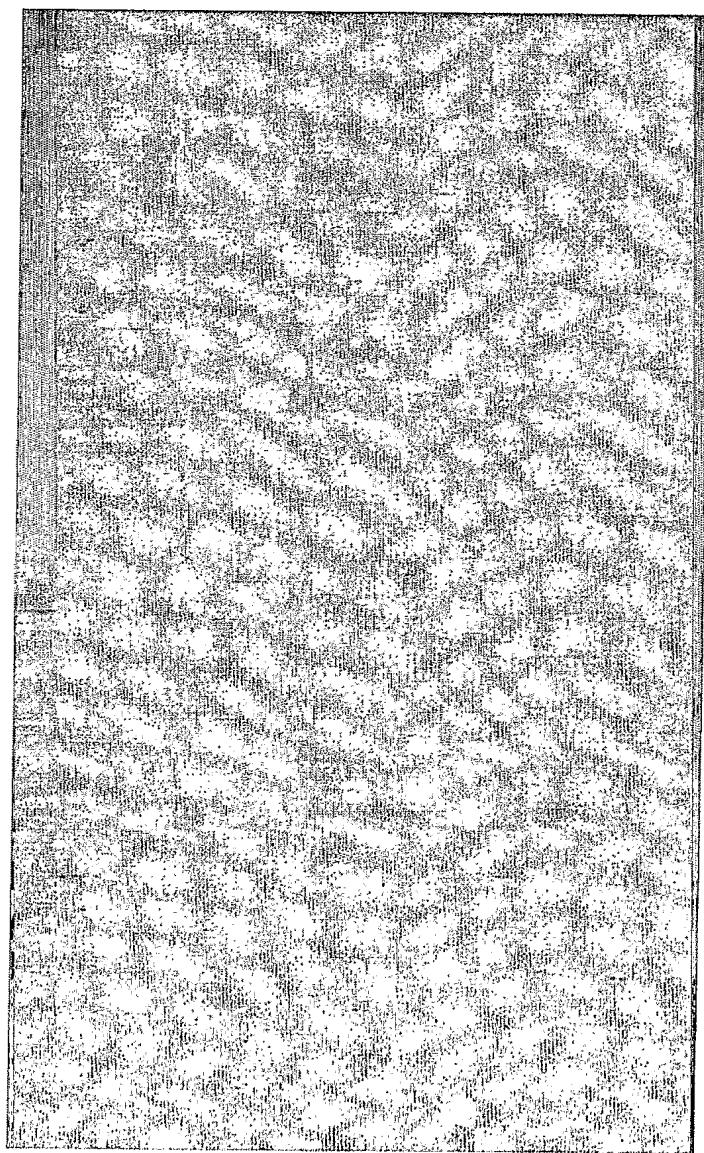


FIG.2

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

  
N° 11235\*03

### DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

### DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

**INV**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		H52 781 C2/MD																			
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0408600																			
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)																					
Méthode et trousse de détermination du statut vaccinal de personnes																					
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>																					
INODIAG																					
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>																					
<table border="1"> <tr> <td><b>1</b></td> <td colspan="2">Nom</td> <td>ESCARGUEL</td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Claude</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td colspan="2">Rue</td> <td>135 Traverse du Gaou - Le Brusc</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Code postal et ville</td> <td>183140 SIX FOURS</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> <td></td> </tr> </table>			<b>1</b>	Nom		ESCARGUEL		Prénoms		Claude	Adresse	Rue		135 Traverse du Gaou - Le Brusc	Code postal et ville		183140 SIX FOURS	Société d'appartenance (facultatif)			
<b>1</b>	Nom		ESCARGUEL																		
	Prénoms		Claude																		
Adresse	Rue		135 Traverse du Gaou - Le Brusc																		
	Code postal et ville		183140 SIX FOURS																		
Société d'appartenance (facultatif)																					
<table border="1"> <tr> <td><b>2</b></td> <td colspan="2">Nom</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="2">Prénoms</td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td colspan="2">Rue</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Code postal et ville</td> <td>11111</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> <td></td> </tr> </table>			<b>2</b>	Nom				Prénoms			Adresse	Rue			Code postal et ville		11111	Société d'appartenance (facultatif)			
<b>2</b>	Nom																				
	Prénoms																				
Adresse	Rue																				
	Code postal et ville		11111																		
Société d'appartenance (facultatif)																					
<table border="1"> <tr> <td><b>3</b></td> <td colspan="2">Nom</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="2">Prénoms</td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td colspan="2">Rue</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Code postal et ville</td> <td>11111</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> <td></td> </tr> </table>			<b>3</b>	Nom				Prénoms			Adresse	Rue			Code postal et ville		11111	Société d'appartenance (facultatif)			
<b>3</b>	Nom																				
	Prénoms																				
Adresse	Rue																				
	Code postal et ville		11111																		
Société d'appartenance (facultatif)																					
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivie du nombre de pages.																					
DATE ET SIGNATURE(S)		Le 28 juillet 2004																			
DU (DES) DEMANDEUR(S)																					
OU DU MANDATAIRE																					
(Nom et qualité du signataire)																					
PORTAL Gérard CPI n° 92-1203																					

